

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO **BỘ Y TẾ**
VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

TRẦN HẢI SƠN

**MUỖI CÁT (DIPTERA: PSYCHODIDAE)
VÀ THỰC TRẠNG NHIỄM FLAVIVIRUS,
LEISHMANIA TẠI 6 TỈNH MIỀN BẮC
VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học
Mã số: 62 42 01 07

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2023

**CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU NÀY ĐƯỢC HOÀN THÀNH
TẠI VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Trần Vũ Phong
2. TS. PGS. Nguyễn Lê Khánh Hằng

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện
hợp tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Vào hồi giờ, ngày tháng năm 2024.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Quốc gia
2. Thư viện Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Vu SN, Tran HS, Tran VP, Tran CT, Tran ND, Dang DA, Nguyen TY, Vu TL, Ngo KP, Nguyen VH, Hoàng NA, Cassan C, Prudhomme J, Depaquit J, Rahola N, Bañuls AL (2021), “axonomical insights and ecology of sandfly (Diptera, Psychodidae) species in six provinces of Northern Vietnam”, *Parasite*. 2021;28:85. doi: 10.1051/parasite/2021080. Epub 2021 Dec 17. PMID: 34928207; PMCID: PMC8686828.
2. Trần Hải Sơn, Nguyễn Lê Khánh Hằng, Trần Vũ Phong, Trần Công Tú, Nguyễn Việt Hoàng, Vũ Thị Liễu, Nguyễn Thị Yên, Ứng Thị Hồng Trang, Vũ Sinh Nam (2022), “Thực trạng nhiễm *Leishmania* trên quần thể muỗi cát cái thu thập tại 6 tỉnh miền bắc việt nam, 2016”, *Tạp chí y học dự phòng tập 32, số 8 năm 2022*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Muỗi cát là véc tơ chính truyền bệnh Leishmaniasis, bệnh lưu hành ở hơn 98 quốc gia với 350 triệu người có nguy cơ mắc và trên 2 triệu ca bệnh mới hàng năm. Ở Việt Nam, muỗi cát lần đầu được ghi nhận vào năm 1935, và kể từ đó cho tới nay đã ghi nhận được 12 loài muỗi cát phân bố từ Bắc tới Nam. Gần đây nhất vào tháng 7/2018, bệnh viện Đa khoa Huế báo cáo một bệnh nhân, ở Quảng Bình nhiễm Leishmania, đồng nhiễm HIV từ năm 2016.

Vai trò truyền Flavivirus của muỗi cát còn chưa rõ ràng mặc dù đã có một số bằng chứng về Flavivirus hay ARN của Flavivirus có liên quan đến muỗi cát như vi rút Saboya được phân lập từ muỗi cát ở Senegal (1991-1992), hai trình tự Flavivirus đã được phát hiện ở muỗi cát *Phlebotomus perniciosus* ở Algeria (2007), Ecuador Paraiso Escondido vi rút (EPEV) ở Ecuador (2011) hay vi rút West Nile tại Niger (2016). ARN Flavivirus cũng đã được phát hiện ở muỗi cát *Phlebotomine* từ Bồ Đào Nha. Trong năm 2014, tại tỉnh Sơn La ghi nhận vụ dịch viêm não vi rút (VNVR) quy mô lớn kéo dài từ tháng 6 đến tháng 9 với 164 ca mắc, trong đó 21 ca tử vong. Các năm gần đây, khu vực miền núi như Hát Lót, Sơn La cũng liên tục ghi nhận các ổ dịch SXHD từ vài chục đến vài trăm trường hợp mắc.

Với mục đích xác định thành phần loài muỗi cát và một số đặc điểm phân bố của chúng tại 6 tỉnh nghiên cứu đồng thời mô tả thực trạng nhiễm của Flavivirus, Leishmania trên muỗi cát cái, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu "Muỗi cát (diptera: psychodidae) và thực trạng nhiễm Flavivirus, Leishmania tại 6 tỉnh miền bắc Việt Nam ". Nghiên cứu với 3 mục tiêu:

- 1) Xác định thành phần loài và một số đặc điểm phân bố của muỗi cát tại 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2016-2018.
- 2) Mô tả thực trạng nhiễm Flavivirus ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu.
- 3) Mô tả thực trạng nhiễm Leishmania ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu.

Những điểm mới về khoa học và giá trị thực tiễn của đề tài:

Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian dài (2016-2023) nên có ý nghĩa khoa học cao khi cập nhật thành phần loài muỗi cát tại địa

điểm nghiên cứu. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam công bố tỉ lệ muỗi cát cái mang Flavivirus và Leishmania.

Những kết quả trong nghiên cứu ngoài việc bổ sung những kiến thức hiện đang còn trống trong gen vắ đỏi với muỗi cát, Flavivirus, Leishmania trên véc tơ mà còn giúp cho các nhà dịch tễ học có chiến lược phù hợp trong việc phòng và chống bệnh.

Nghiên cứu cũng đặc biệt quan trọng trong thời điểm hiện tại khi cung cấp thông tin về hai tác nhân Flavivirus và Leishmania trên véc tơ muỗi cát giúp cung cấp những nhận định chính xác hơn xu hướng những nghiên cứu về phòng bệnh SXHD hay Leishmaniasis.

Cấu trúc của luận án

Luận án gồm: 116 trang không kể tài liệu tham khảo và phụ lục, có 12 bảng, 39 hình và 1 sơ đồ. Đặt vấn đề 2 trang. Tổng quan 45 trang; Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 20 trang; Kết quả 26 trang; Bàn luận 20 trang; Kết luận 2 trang và Khuyến nghị 1 trang

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Muỗi cát và một số đặc điểm dịch tễ

Trong số hơn 800 loài muỗi cát đã được công nhận, khoảng 464 loài được tìm thấy ở Tân thế giới (New World) và 375 loài ở Cổ thế giới (Old World). Ngành: Chân khớp (Arthropoda), Lớp: Côn trùng (Insecta), Bộ: Hai cánh (Diptera), Phân bộ Nematocera, Họ: Psychodidae, Phân họ: Phlebotominae (Bigot 1854, K.Kertész 1903). Phân họ Phlebotominae thành sáu giống: ba giống từ Cổ thế giới (Phlebotomus [13 phân giống], Sergentomyia [10 phân giống], và Chinius [4 loài]) và ba giống từ Tân thế giới (Lutzomyia [26 phân giống và nhóm], Brumptomyia [24 loài] và Warileya [6 loài]). Hiện nay 78 loài muỗi cát đã được chứng minh là véc tơ của của Leishmania. Trong số các vectơ muỗi cát nêu trên, 7 loài tham gia vào việc truyền tải *L. major*, 7 loài truyền *L. tropica*, 31 loài truyền *L. infantum*, và 9 loài truyền *L. donovani*.

Muỗi cát là loài côn trùng vòng đời biến thái hoàn toàn. Trong chu kỳ phát triển có 4 pha riêng biệt: trứng, ấu trùng, nhộng và con trưởng thành. Ở Việt nam muỗi cát khá phổ biến và có thể gặp ở nhiều sinh cảnh khác nhau. Muỗi cát (sandfly) đã được ghi nhận là véc tơ truyền Leishmania tại Việt Nam từ những năm 1930.

1.2. Flavivirus và một số đặc điểm dịch tễ

1.2.1. Đặc điểm chung của virút nhóm Flavivirus

1.2.1.1. Phân loại

Họ Flaviviridae bao gồm có 4 chi: Flavivirus, Hepacivirus, Pestivirus và Pegivirus., chi này có hơn 53 thành viên trong đó có các bệnh do véc tơ truyền do vi rút Dengue gây sốt Dengue, sốt xuất huyết Dengue, hội chứng shock Dengue; vi rút gây viêm não Nhật Bản; vi rút sốt vàng gây bệnh sốt vàng da; vi rút Chikungunya, Kyasanur Forest disease, Murray Valley encephalitis, Omsk hemorrhagic fever, tick-borne encephalitis, West Nile fever, và Zika.

1.2.1.2. Đặc điểm hình thái và cấu trúc vật chất di truyền nhóm Flavivirus

Vi rút nhóm Flavivirus có hình cầu, đường kính 40 - 60 nm, bên trong lõi của vi rút là nucleocapsid là cấu trúc của hệ gen vi rút cùng protein C. Nucleocapsid được bao quanh bởi màng (vỏ vi rút) là lớp lipid kép, chứa glycoprotein và protein có nguồn gốc từ màng sinh chất của tế bào.

Hệ gen của Flavivirus là một ARN sợi dương có cấu trúc CAP ở đầu 5' and và đặc biệt thiếu đuôi poly-A ở đầu 3'[55]. Bộ gen của vi rút mã hóa cho một polyprotein đơn, sau khi được phiên mã bởi các protease của vi rút và vật chủ, tạo thành 10 protein cấu trúc (C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5)

1.2.2. Sự nhân lên của vi rút thuộc nhóm flavivirus

Các Flavivirus nhân lên trong tế bào chất và lắp ráp hạt vi rút xảy ra trong các túi nội bào.

1.2.3. Đặc tính kháng nguyên

Các Flavivirus đều chung vị trí kháng nguyên. Ít nhất tám khu phức hợp kháng nguyên đã được xác định dựa trên các thí nghiệm trung hòa.

1.2.4. Chuẩn đoán phòng thí nghiệm

1.2.4.1. Phát hiện ARN vi rút

Phản ứng thực hiện để phát hiện Flavivirus là RT-PCR hoặc Realtime RT-PCR trong đó Realtime RT-PCR cho thời gian trả kết quả nhanh hơn RT-PCR truyền thống. Các phản ứng, quy trình RT-PCR được sử dụng phát hiện hiện nay tập trung vào đoạn gen đích mã hóa vỏ vi rút (E-encoding gene), mã hóa màng vỏ (M/E-encoding gene), mã hóa (pE) và mã hóa protein NS5, NS3, NS1.

1.2.4.2. Phương pháp phân lập vi rút

Phương pháp phân lập vi rút thường kéo dài từ 1-3 tuần, vì vậy không đáp ứng được yêu cầu chẩn đoán nhanh, tuy nhiên kết quả thu được bằng phương pháp này cung cấp nhiều thông tin vi rút phục vụ nghiên cứu vi rút học, bệnh học và phát triển vắc xin

1.2.4.3. Phát hiện kháng thể kháng

Phương pháp huyết thanh học sẽ phức tạp tại những nơi lưu hành nhiều vi rút thuộc nhóm Flavivirus (DENV, viêm não nhật bản B, sốt vàng)

1.2.5. Bệnh do Flavivirus lây truyền qua véc tơ đang lưu hành ở Việt Nam

Bệnh do Flavivirus lây truyền qua véc tơ đang lưu hành ở Việt Nam bao gồm Dengue, VNNB, Zika.

1.3. Leishmania và một số đặc điểm dịch tễ

1.3.1. Bậc phân loại của *Leishmania*

Giới	Protista (Haeckel, 1866),
Lớp	Kinetoplastea (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976),
Phân lớp	Metakinetoplastina (Vickerman, 2004),
Bộ	Trypanosomatida (Kent, 1880),
Họ	Trypanosomatidae (Döflein, 1901),
Phân họ	Leishmaniinae (Maslov and Lukeš 2012)
Giống	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903).

1.3.2. Ký sinh trùng *Leishmania* và chu kỳ sống

Có khoảng 21 loài thuộc giống *Leishmania* gây bệnh cho con người. Có thể phân biệt chúng trên cơ sở các tiêu chí sinh học, hoặc phân tích trong phòng thí nghiệm (chủ yếu là phân tích isoenzym và phân tích DNA), hoặc những triệu chứng lâm sàng và dịch tễ học khác nhau.

1.3.3. Đặc điểm genome của *Leishmania*

Leishmania có các đặc điểm tổ chức bộ gen độc đáo so với sinh vật nhân chuẩn, như gen không có intron, polycistron và nhiễm sắc thể nhỏ với mật độ gen cao. Hơn nữa, những con trùng roi này sở hữu một ty thể duy nhất được gọi là kinetoplast, chứa một mạng lưới lớn ADN kinetoplast (kDNA).

1.3.3.1. ADN nhiễm sắc thể

Các gen ARN ribosome (rRNA) nằm hầu hết trên nhiễm sắc thể số 27, thường tồn tại nhiều bản sao với kích thước xấp xỉ 12,5 kb [86]. Trong

số các thành phần khác nhau của các gen này, các vùng ITS lý tưởng cho việc định loài. Các 18S rRNA là một ARN cấu trúc của SSU ribosome. Sự bảo tồn cao của gen này và các vùng bên sườn của nó làm cho nó thích hợp để tái tạo lại các mối quan hệ phát sinh loài.

1.3.3.2. Các gen mã hóa protein

Các thành viên của *Leishmania* sở hữu 36 nhiễm sắc thể, ngoại trừ phức hợp *L. mexicana* có 34 nhiễm sắc thể. Phân giống *Viannia* có 35 nhiễm sắc thể. Phân giống *Sauro* *Leishmania* có 38 nhiễm sắc thể. Bộ gen của *Leishmania* nhỏ gọn với kích thước là 33 Mb.

1.3.3.3. ADN ngoài nhiễm sắc thể

Tất cả các trùng roi kinetoplastid đều sở hữu một bộ gen ty thể duy nhất được gọi là ADN động bào (kDNA), bao gồm vài nghìn phân tử ADN hình tròn liên kết với nhau trong một mạng lưới nối gồm hàng nghìn minicircles (khoảng 1 kb mỗi vòng) và vài chục maxicircles (xấp xỉ 23 kb mỗi vòng).

1.3.4. Phương pháp chẩn đoán *Leishmania* trong phòng thí nghiệm

1.3.4.1. Phương pháp xác định *Leishmania*

Các phương pháp chẩn đoán khác nhau và khả năng phát hiện, xác định và định lượng các loài *Leishmania*, cũng như khả năng phân biệt của chúng ở các cấp độ khác nhau (giống, phân giống, loài, phức hợp loài, loài và quần thể)

1.3.4.2. Phương pháp phân biệt các phức hợp loài *Leishmania*

Việc xác định và phân biệt các phức hợp loài *Leishmania* và các loài có thể được thực hiện thông qua các kỹ thuật sinh học phân tử khác nhau. Nested PCR và semi-nested PCR có thể được sử dụng để phân biệt loài với các loại môi thích hợp.

Phương pháp Sanger đang được cải thiện nhanh chóng về chất lượng, độ dài đọc, tốc độ, chi phí và nó được sử dụng rộng rãi để nhận dạng của các phức hợp loài *Leishmania* và các nghiên cứu phát sinh loài [162, 163].

Công nghệ giải trình tự thế hệ mới (NGS) trong việc phân tích bộ gen *Leishmania* gần đây đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc khám phá các đa dạng di truyền khác nhau bao gồm đa hình nucleotide đơn (SNPs), các biến thể số bản sao (CNVs), các biến thể cấu trúc một cách chi tiết và cung cấp những hiểu biết có giá trị về sự phức tạp của bộ gen và quy định gen. Việc phân tích bộ gen của *Leishmania* gặp phải một thách

thức vì sự hiện diện thường xuyên của thể dị bội. Điều này làm ảnh hưởng đến độ chính xác của việc phát hiện tất cả các biến thể di truyền.

1.3.5. Leishmaniasis và một số đặc điểm dịch tễ

1.3.5.1. Dịch tễ học bệnh Leishmaniasis trên thế giới

Bệnh Leishmaniasis ảnh hưởng đến phần lớn những người nghèo ở các nước đang phát triển; 350 triệu người được coi là có nguy cơ nhiễm bệnh Leishmaniasis, và khoảng 2 triệu trường hợp mới xảy ra hàng năm. Khoảng 95% các trường hợp CL xảy ra ở Châu Mỹ, lưu vực Địa Trung Hải, Trung Đông và Trung Á với 132.568 ca bệnh đã được báo cáo trong khu vực này vào năm 2012. Trong báo cáo về gánh nặng gen tẻ của các bệnh truyền nhiễm và ký sinh trùng trên toàn thế giới Hotez đã xếp bệnh Leishmaniasis đứng thứ 9 với 2.357.000 ca bệnh hằng năm chủ yếu xảy ra ở Châu Phi, Đông Nam Á, Đông Địa Trung Hải, Tây Thái Bình Dương, Châu Mỹ và Châu Âu trong đó khu vực Đông Nam Á là nặng nề nhất với khoảng 67,3% tổng số ca mắc của toàn thế giới.

1.3.5.2. Dịch tễ học bệnh Leishmaniasis tại Việt Nam

Từ năm 1978 đến 2018 các trường hợp bệnh được báo cáo rải rác tập trung chủ yếu ở khu vực Miền Bắc Việt Nam. Tổng số 6 bệnh nhân đượ ghi nhận có liên quan đến ký sinh trùng Leishmania, trong đó có 4 trường hợp bệnh xác định có sự đồng nhiễm với HIV

1.3.6. Đặc điểm lâm sàng, điều trị và phòng ngừa

Theo đặc điểm lâm sàng, có thể chia thành 3 thể bệnh sau:

1.3.6.1. Bệnh Leishmaniasis ở da (CL-cutaneous Leishmaniasis)

Bệnh Leishmaniasis CL cư trú ở da, thời gian ủ bệnh vài tuần đến vài tháng. Tác nhân gây bệnh là nhiễm *L. major* hoặc *L. tropica*

1.3.6.2. Bệnh Leishmaniasis nội tạng (VL- visceral Leishmaniasis)

Bệnh Leishmaniasis nội tạng cư trú ở cơ quan nội tạng, thời gian ủ bệnh trong hầu hết các trường hợp 3-6 tháng, cũng có trường hợp vài tuần đến vài năm. Các triệu chứng chính sốt, sung lách, tăng Ig gamma máu, thiếu máu cấp tính, giảm bạch cầu. Nếu không điều trị bệnh nhân sẽ tử vong trong vòng hai năm do biến chứng suy mòn và nhiễm khuẩn thứ phát.

1.3.6.3. Bệnh Leishmaniasis ở da và niêm mạc (MCL : mucocutaneous Leishmaniasis)

Bệnh Leishmaniasis ở da và niêm mạc ít phổ biến.

1.3.6.4. Điều trị và phòng ngừa

Điều trị VL thường được thực hiện với các chất thuộc nhóm pentavalent antimonials (meglumin antimonat, natri stibogluconat) pentamidin, hoặc amphotericin B.

Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 1

Nội dung: Xác định thành phần loài và một số đặc điểm phân bố của muỗi cát tại 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2016-2018.

2.1.1. Địa điểm nghiên cứu

Sáu tỉnh được lựa chọn cho nghiên cứu là tỉnh: Quảng Ninh, Ninh Bình, Lạng Sơn, Lào Cai, Hà Giang và Sơn La. (Hình 3.1)

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu: Muỗi cát (Sand fly), ngành Chân khớp (Arthropoda), lớp: Côn trùng (Insecta), bộ: Hai cánh (Diptera), Họ: Psychodidae, Giống: Phlebotominae.

2.1.3. Thời gian thu mẫu: Từ tháng 30/5/2016 đến tháng 13/10/2016

2.1.4. Thiết kế nghiên cứu: Điều tra mô tả cắt ngang

2.1.5. Cỡ mẫu: Sử dụng phương pháp chọn mẫu toàn bộ.

2.1.6. Phương pháp thu thập muỗi cát tại các sinh cảnh khác nhau

2.1.6.1. Phương pháp thu mẫu: Sử dụng bẫy đèn CDC (CDC miniature light traps, John GEN. Hock Co. FL, U.S. A.) để thu thập muỗi cát.

2.1.6.2. Phương pháp sàng lọc muỗi cát tại thực địa: Phân biệt muỗi cát với các loại muỗi-côn trùng khác dựa vào các đặc điểm hình thái học đặc trưng. Lưu mẫu: Muỗi đực: cất giữ tube 1,5ml chứa cồn 70%, muỗi cái: cất giữ trong tube 1,5ml trong ni tơ lỏng.

2.1.7. Phương pháp làm tiêu bản: Thực hiện tại Khoa Côn trùng và động vật gen học - Viện VSDTTW.

2.1.8. Phương pháp định loại muỗi: Định loại dựa trên theo khóa định loại của Lewis (1978, 1987) và Killick Kendrick và cs. (1991) bổ sung thêm so sánh với mô tả của Newstead (1911), Raynal (1936), Abonnenc E. 1972, Johnson GEN. 1991 và Lewis 1982 [11, 25, 181-184]. Hình ảnh tiêu bản được quan sát bằng hệ thống camera trên kính hiển vi điện tử nilkon E600 và phân tích hình ảnh với phần mềm NIS-Elements. Các hình ảnh kết quả định loại được gửi và khẳng định tại Viện nghiên cứu Montpellier, Cộng hòa Pháp (IRD).

2.1.9. Các chỉ số đầu ra trong nghiên cứu

Độ phong phú: $RA = (\text{Tổng số cá thể loài} / \text{Tổng số cá thể bắt được}) \times 100$

Mật độ: $D = \text{Tổng số cá thể loài} / \text{Tổng số bẫy đặt} / \text{Số ngày đặt bẫy}$

Mức ý nghĩa: $Mean = \text{Tổng số cá thể thu được} / \text{Tổng số bẫy đặt}$

Số loài: $SR = \text{Số loài ở sinh cảnh thu thập (bao gồm cả } Se. sp2 \text{ và } Se. sp3)$

2.1.10. Nhập liệu và phân tích

Số liệu được nhập bằng Excel, phân tích bằng phần mềm stata ver 14 và Excel. Hình ảnh được chụp và đo đạc bằng phần mềm NIS-Elements. Sử dụng phân tích thống kê Kruskal–Wallis test để so sánh phân bố của muỗi cát theo tỉnh và theo sinh cảnh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 2

Nội dung: Mô tả thực trạng nhiễm Flavivirus ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu.

2.2.1. Địa điểm nghiên cứu: Khoa Côn trùng và Động vật y học

2.2.2. Đối tượng nghiên cứu: Các vi rút trong chi Flavivirus, họ Flaviviridae trong mẫu bệnh phẩm thu thập tại mục tiêu 1.

2.2.3. Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang có phân tích phòng thí nghiệm

2.2.4. Cỡ mẫu: Toàn bộ mẫu ngực bụng của muỗi cát cái được thu thập: 1009 mẫu.

2.2.5. Sinh phẩm và trang thiết bị: sinh phẩm tách chiết ADN/ARN: Proteinase K; β -mercaptoethanol 48,7%; Chloroform: isoamyl alcohol (24:1): 2-propanol; dung dịch CTAB. Sinh phẩm PCR: QIAGEN Onestep RT-PCR; cặp mồi cho phản ứng RT-PCR

-Chứng chuẩn: + Chứng dương (Positive control – POS): DEN 1-4 (PTN Vi rút Arbo, Khoa Vi rút, Viện VSDTTU); Chứng âm (No Template Control - NTC): sử dụng nước cất để kiểm tra quá trình pha sinh phẩm hóa chất; Chứng âm tách chiết (Negative Extraction Control – NEC): sử dụng nước cất để kiểm tra quá trình tách chiết

2.2.6. Xác định/định danh Flavivirus bằng kỹ thuật RT-PCR

Nhận định kết quả: kết quả được chấp nhận khi: Chứng dương: có băng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế (250 bp); Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): âm tính. Âm tính với nhóm Flavivirus: sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR. Dương tính

với nhóm Flavivirus: sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước 250 bp. Những mẫu dương tính với nhóm Flavivirus sẽ được giải trình tự gen Sanger

2.2.7. Giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger

Tinh sạch sản phẩm PCR: Tinh sạch sản phẩm PCR. Sử dụng sinh phẩm: ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent. Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp sản phẩm PCR để giải trình tự gen (phản ứng PCR sequencing):

Mỗi phản ứng cho một loại môi tương ứng là cFD2 và MAMD

Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự gen: Sản phẩm PCR giải trình tự gen được tinh sạch bằng bộ kit Dye Ex 2.0 Spin.

Chạy máy giải trình tự ABI 3100-Avant™ Genetic Analyser.

2.2.8. Nhập liệu và phân tích

Số liệu được nhập bằng Excel, phân tích bằng phần mềm stata ver 14 và Excel. Phân tích trình tự gen bằng chức năng BLAST trên NCBI, định danh trên Web Flavivirus Genotyping Tool Version 0.0.

2.3. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 3

Nội dung: Mô tả thực trạng nhiễm *Leishmania* ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu.

2.3.1. Địa điểm nghiên cứu: Khoa Côn trùng và Động vật GEN học - Khoa Vi rút – Viện VSDTTW

2.3.2. Đối tượng nghiên cứu: Các ký sinh trùng *Leishmania* trên muỗi cát thu thập trong mục tiêu 1.

2.3.3. Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang có phân tích phòng thí nghiệm

2.3.4. Cỡ mẫu: Toàn bộ mẫu ngực bụng của muỗi cát cái được thu thập: 1009 mẫu.

2.3.5. Sinh phẩm và trang thiết bị

- Sinh phẩm tách chiết ADN/ARN: tương tự mục 2.2.5

- Sinh phẩm Nested PCR: GoTaq; Cặp môi cho phản ứng Nested-PCR
Chứng chuẩn:

+ Chứng dương (Positive control – POS): *Leishmania infantum* 680 bp.

+ Chứng âm (No Template Control - NTC): sử dụng nước không chứa DNase-RNase để kiểm tra quá trình pha sinh phẩm hóa chất

- + Chứng âm tách chiết (Negative Extraction Control – NEC): sử dụng nước không chứa Dnase-Rnase để kiểm tra quá trình tách chiết
- Trang thiết bị: tương tự mục 2.2.5.

2.3.6. Phản ứng Nested PCR

Pha sinh phẩm cho phản ứng Nested-PCR: theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm Gotaq (Promega), cặp môi ngoài CBS2XF-CBS1XR, cặp môi trong LIR-13Z

Nhận định kết quả: Kết quả được chấp nhận khi:

- + Chứng dương: có băng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp môi thiết kế 680 bp.
- + Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): âm tính.
- Âm tính với nhóm *Leishmania*: sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.
- Dương tính với nhóm *Leishmania*: sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước trên 500 bp. Kích thước band tương ứng: *L. amazonensis* MHOM/BR/73/LV78 (517bp); *L. major* MHOM/ET/95/FV1 (560-570 bp); *L. infantum* (680 bp); *L. tropica* (750 bp) [130].
- Những mẫu dương tính bằng Nested-PCR được thực hiện giải trình tự gen (NGS).

2.3.7. Phương pháp giải trình tự gen NGS (Next generation sequencing)

Sử dụng sinh phẩm và hóa chất của bộ kit Nextera XT DNA Library Prep. Đồng đều thư viện mẫu bằng máy ISEQ 100 sử dụng phương pháp Standard Normalization – Illumina.

2.3.8. Phân tích bữa ăn máu

Cỡ mẫu: DNA của muỗi cát cái được ghi nhận no máu và dương tính với *Leishmania* sẽ được dùng để xác định các bữa ăn máu. Việc này nhằm xác định chủng *Leishmania* này liên quan đến bữa ăn máu của muỗi cát là máu người hay động vật. Tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi không tiến hành phân tích bữa ăn máu do các mẫu dương tính với *Leishmania* trong đề tài đều không ghi nhận có máu.

2.3.9. Nhập liệu và phân tích

Số liệu được nhập bằng Excel, phân tích bằng phần mềm Stata ver 14 và Excel. Dữ liệu sau khi giải trình tự, sử dụng file FastQ để phân tích.

Chương 3. KẾT QUẢ

3.1. Thành phần loài và một số đặc điểm phân bố của muỗi cát tại 6 tỉnh miền bắc việt nam, 2016-2018

3.1.1. Thành phần loài muỗi cát theo giống, mật độ và độ phong phú

Bảng 3.1. Số lượng, giới tính, mật độ và độ phong phú của muỗi cát theo loài tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam, 2016-2018

Loài	Số lượng	Cái/Đực ^{*n}	Mật độ	Độ phong phú
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) sylvatica</i>	249	87/161 (*1)	0,0253	9,632
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) brevicaulis</i> group	66	49/17	0,0067	2,553
<i>Segentomyia (Parrotomyia) barraudi</i> group	324	303/21	0,0329	12,534
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) bailyi</i>	55	44/11	0,0056	2,128
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus</i>	49	46/3	0,0050	1,896
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) perturbans</i>	11	5/6	0,0011	0,426
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) khawi</i>	25	7/18	0,0025	0,967
<i>Sergentomyia</i> sp2	201	140/58 (*3)	0,0204	7,776
<i>Sergentomyia</i> sp3	10	8/2	0,0010	0,387
<i>Sergentomyia und_sp</i>	83	65/18	0,0084	3,211
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) sp.</i>	4	4/0	0,0004	0,155
<i>Sergentomyia</i> sp.	990	50/928 (*12)	0,1006	38,298
<i>Grassomyia indica</i>	6	1/5	0,0006	0,232
<i>Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni</i>	102	46/55 (*1)	0,0104	3,946
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) yunshengensis</i>	87	28/59	0,0088	3,366
<i>Phlebotomus (Larrousius) betisi</i>	50	3/47	0,0051	1,934
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai</i>	35	17/18	0,0036	1,354
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) sp.</i>	21	5/16	0,0021	0,812
<i>Phlebotomus (Larrousius) sp.</i>	12	4/8	0,0012	0,464
<i>Phlebotomus</i> sp.	33	25/8	0,0034	1,277
<i>Idiophlebotomus</i> sp.	14	6/8	0,0014	0,542
<i>Chinius junlianensis</i>	31	27/4	0,0031	1,199
NA	127	79/40 (*8)	0,0129	4,913
Tổng số	2585	1049/1511 (*25)	0,2626	100

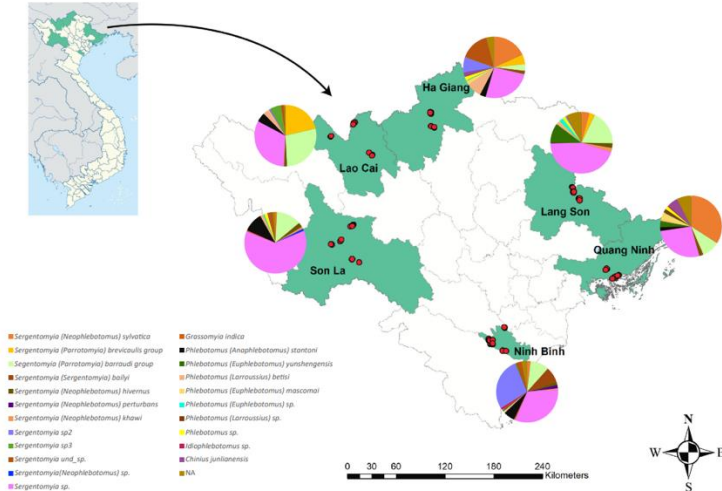
*n số lượng không thể phân biệt cái/đực, NA: số lượng không thể định loài.

Kết quả định loại cho thấy có 5 giống (genus) muỗi cát: *Sergentomyia* (n=2067, 79,96%) chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là *Phlebotomus* (n=340, 13,15%), *Chinus* (n=31, 1,2%), *Idiophlebotomus* (n=14, 0,54%) và *Grassomyia* (n=6, 0,23%) (Bảng 3.1).

Tổng số 13 loài đã được định danh, trong đó *Sergentomyia* có 7; loài *Phlebotomus* có 4 và *Chinius* có 1 loài.

3.1.2. Phân bố muối cát theo tỉnh

Giống *Sergentomyia* chiếm ưu thế nhất trong 6 tỉnh. Phân tích thống kê kê cho thấy sự phân bố theo giống giữa các tỉnh không có sự khác biệt đáng kể. Nhưng việc phân bố theo loài, bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3*, thì rất khác biệt giữa các tỉnh ($p\text{-value} = 0.002$, $\alpha = 0.05$).



Hình 3.1. Các điểm thu thập và thành phần loài muỗi cát ở 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2016

3.1.3. Phân bố muối cát theo sinh cảnh

Muỗi cát được thu thập nhiều nhất trong các hang động ($n = 1431$, độ phong phú tương đối $RA = 55,36$ và $D_{\text{hang}} = 0,79$). Độ phong phú loài cao nhất là ở hang ($SR_{\text{hang}} = 15$, bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3*). Về mức độ phong phú tương đối, chúng tôi cũng đã thu thập được nhiều muỗi cát ngoài nhà, với 936 mẫu vật tương ứng với $RA=36,21$ và độ phong phú của loài $SR=15$ (bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3*). Tuy nhiên, mật độ muỗi cát được thu thập bằng các bẫy đặt trong chuồng nuôi chó cao hơn so với đặt ngoài nhà ($D_{\text{chuồng chó}} = 0,36$, $D_{\text{ngoài nhà}} = 0,23$). Mật độ muỗi cát trong nhà thấp và tương tự với mật độ trong chuồng gà/gia cầm/vịt và thấp hơn mật độ trong chuồng nuôi nhốt gia súc trâu/bò/dê ($D_{\text{trong nhà}} = 0,08$; $D_{\text{chuồng gia cầm}} = 0,10$; $D_{\text{chuồng gia súc}} = 0,12$). Sự phân bố này theo sinh cảnh là không khác biệt đáng kể giữa 6 tỉnh. Trong các hang động số lượng loài là nhiều nhất, tất cả các giống và loài đã được tìm thấy (Bảng 3.3 và hình 3.1). Các phân tích

thống kê cho thấy sự phân bố của các loài là khác nhau tùy theo sinh cảnh (p -value $< 0,01$, $\alpha = 0,01$).

Bảng 3.3. Số lượng muỗi cát, độ phong phú, mật độ và số lượng loài theo sinh cảnh

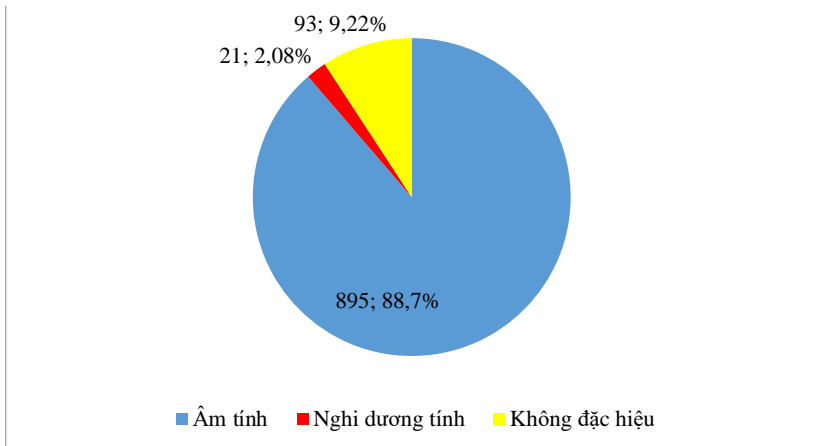
Tên loài	Chuồng gia súc	Hang	Chuồng gia cầm	Chuồng chó	Trong nhà	Ngoài nhà
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) sylvatica</i>	1	141	14	1		92
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) brevicaulis group</i>		45				21
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) barraudi group</i>	4	172	4		1	138
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) bailyi</i>	15	10	5		3	17
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus</i>	3	10	5	1		28
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) perturbans</i>		6			1	4
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) khawi</i>	3	16			1	5
<i>Sergentomyia sp2</i>	5	135	2		3	55
<i>Sergentomyia sp3</i>		9				1
<i>Sergentomyia und sp</i>		20	1		2	60
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) sp.</i>		4				
<i>Sergentomyia sp.</i>	12	566	12	2	6	378
<i>Grassomyia indica</i>		4				2
<i>Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni</i>	11	32	8	7	11	24
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) yunshengensis</i>		80		1		6
<i>Phlebotomus (Larrousius) betisi</i>		19	1			30
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai</i>	2	24		1		8
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) sp.</i>		14	2			4
<i>Phlebotomus (Larrousius) sp.</i>		10	1	1		
<i>Phlebotomus sp.</i>	3	15	2	1		11
<i>Idiophlebotomus sp.</i>		7				7
<i>Chinius junlianensis</i>	1	24				6
NA	5	68	9	1	2	39
Tổng	65	1431	66	16	30	936
Độ phong phú (RA)	2,51	55,36	2,55	0,62	1,16	36,21
Mật độ (D)	0,12	0,79	0,10	0,36	0,08	0,23
Mức ý nghĩa (Mean)	1,44	15,66	1,57	1,78	1,07	5,29
Số loài (SR)*	9	15	7	5	6	15

NA: số lượng không thể định loài; * bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3*

3.1.4. Phân bố muỗi cát cái tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam, 2016
 Muỗi cát cái được thu thập tại 6/6 tỉnh trong nghiên cứu. Số lượng muỗi cát cái thu thập được nhiều nhất tại Ninh Bình và Lạng Sơn với số lượng 298 cá thể (28,41%) và 294 cá thể (28,03%), tiếp đến là Hà Giang 159 cá thể (15,16%), Quảng Ninh 125 cá thể (11,92%), Sơn La với 98 cá thể (9,34%) và Lào Cai 75 cá thể (7,15%).

3.2. Thực trạng nhiễm Flavivirus ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu

3.2.1. Sàng lọc Flavivirus trên muỗi cát cái



Hình 3.4. Kết quả sàng lọc Flavivirus trên muỗi cát cái

Kết quả sàng lọc Flavivirus trên muỗi cát cho thấy có 21/1009 mẫu được nghi ngờ là dương tính với Flavivirus hay ARN Flavivirus có liên quan đến muỗi cát (2,08%). 895 mẫu được xác định là âm tính với Flavivirus, chiếm tỉ lệ 88,7%, còn lại 93 mẫu có sản phẩm PCR, tuy nhiên lại không đặc hiệu với Flavivirus, các mẫu này chiếm tỉ lệ 9,22% (Hình 3.4). Toàn bộ 21 mẫu dương tính với Flavivirus bằng phương pháp RT-PCR sẽ được tiến hành giải trình tự gen để khẳng định sự có mặt của Flavivirus trong quần thể loài muỗi cát được thu thập.

3.2.2. Xác định Flavivirus bằng phương pháp giải trình tự gen Sanger

Kết quả thu được sau khi giải trình tự của 21 mẫu nghi ngờ thu được kết quả: 16 mẫu mà trong đó chúng tôi không tìm thấy bất cứ thông tin nào khi so sánh các trình tự của các mẫu đó lên cơ sở dữ liệu gen của NCBII. Có 3 mẫu có các trình tự cho kết quả tương đồng với Flavivirus, tuy nhiên độ dài đoạn tương đồng quá ngắn (<31bp) để xác định. Có 2 mẫu số 4 (M2.25.56) và 17 (M3.57.07) có các trình tự được xác định có liên quan và tương đồng với Dengue tuýp 2 (DEN2).

Bảng 3.4. Vị trí các đoạn ARN thu được trên vùng gen NS5 của Flavivirus

Mẫu	Vị trí bắt đầu	Độ dài	Vị trí cuối cùng	Kết quả BLAST	Kết quả cluster
M2.25.56	8928	223	9159	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	Dengue virus 2
M3.53.07	8952	237	9189	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	Dengue virus 2

3.2.3. Một số đặc điểm Flavivirus trên các loài muỗi cát cái

Trong số 6 tỉnh điều tra, kết quả sàng lọc ghi nhận sự xuất hiện của các đoạn ARN của Flavivirus nói chung và DEN2 trên các cá thể muỗi cát cái ở 2 tỉnh là Ninh Bình và Lạng Sơn. Các tỉnh còn lại là Hà Giang, Lào Cai và Quảng Ninh, Sơn La chưa tìm thấy dấu vết của Flavivirus trên quần thể muỗi cát. Tỷ lệ muỗi cát cái mang ARN của Flavivirus (DEN2) trên quần thể muỗi cát cái nghiên cứu của chúng tôi là 0,198 % (n=2/1009)

Bảng 3.5. Thông tin mẫu nghi nhiễm Flavivirus trên quần thể muỗi cát

Tỉnh	Vĩ độ	Kinh độ	Muỗi cát	Sinh cảnh	Flavivirus
Ninh Bình	20°13.983'	105°42.704'	<i>Sergentomyia sp2</i>	Hang	DENV2
Lạng Sơn	21°56.069'	106°41.061'	<i>Sergentomyia barraudi</i>	Hang	DENV2

3.3. Thực trạng nhiễm Leishmania ở muỗi cát

3.3.1. Sàng lọc Leishmania bằng phương pháp Nested-PCR

Trong số 1009 mẫu được sàng lọc, 20 mẫu nghi ngờ nhiễm Leishmania và 989 mẫu âm tính.

Bảng 3.6. 20 mẫu nghi nhiễm Leishmania bằng phương pháp Nested-PCR

Nhóm mẫu	Số lượng	Ký hiệu mẫu	Kích thước sản phẩm (bp)
1	02	Mẫu 68 (Hình 3.7A-L1) Mẫu 895 (Hình 3.7B-L6)	300
2	06	Mẫu 79 (hình 3.7A-L4) Mẫu 99 (hình 3.7A -L2) Mẫu 906, 907, 909, 910 (hình 3.8B -L7)	500
3	05	Mẫu 96 (hình 3.7A -L1) Mẫu 181(hình 3.7B -L5) Mẫu 900, 897 (hình 3.7B -L6) và 912 (hình 3.7B -L7)	600-750
4	07	Mẫu 69 (hình 3.7A -L2), Mẫu 75, 92 (hình 3.7A -L3) Mẫu 904, 905, 899 (hình 3.7B - L6) và 663 (hình 3.7B – L8)	>=800

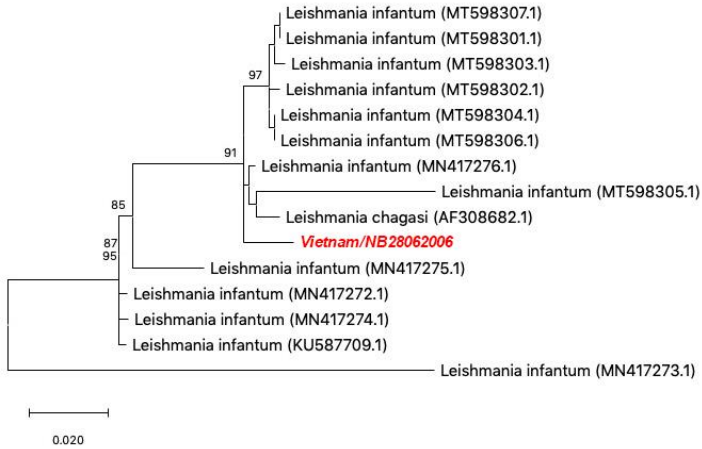
Toàn bộ 20 mẫu này sẽ được tiến hành giải trình tự gen để khẳng định sự có mặt của Leishmania trong quần thể loài muỗi cát được thu thập.

3.3.2. Xác định Leishmania bằng phương pháp giải trình tự gen NGS
Giải trình gen bằng phương pháp NGS với bộ kit Nextera XT DNA Library Prep. Đồng đều thư viện mẫu bằng máy ISEQ 100 sử dụng phương pháp Standard Normalization – Illumina.

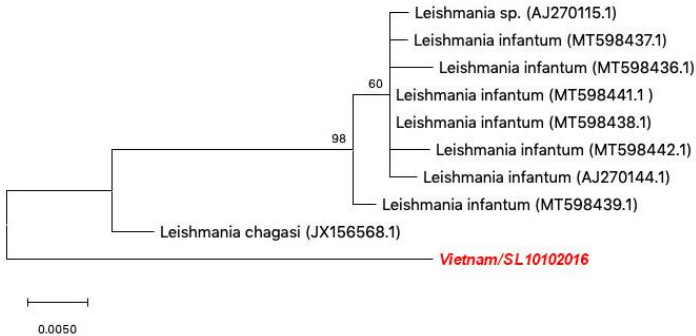
Kết quả thu được sau khi giải trình tự của 20 mẫu nghi ngờ chúng tôi thu được tổng số 121,651 đoạn trình tự (10GB) với kích thước từ 20 bp đến 1728 bp (trung bình 73,945 bp). Chúng tôi loại bỏ các đoạn trình tự có kích thước quá nhỏ (dưới 200bp) thu được 71 đoạn trình tự gen phân tích.

Trong số 71 trình tự thu được có 40 trình tự không tìm thấy thông tin khi Blast lên cơ sở dữ liệu gen của NCBI, 21 trình tự cho kết quả tương đồng tuy nhiên thông tin loài thu được không liên quan đến Leishmania. Chỉ có 10 trình tự được xác định là Leishmania thuộc về 3 mẫu: 2, 4, 20. Mẫu số 2 và 20 có trình tự gen tương đồng với các class 13, 16, 18,

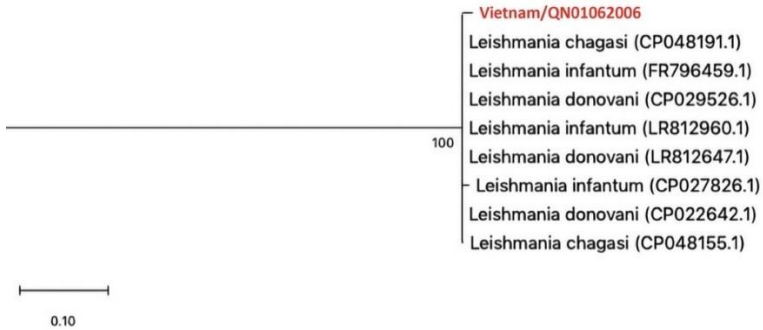
25, 31, 38, 39 và 50 trên gen minicircle kinetoplas của *Leishmania infantum*, trong khi đó mẫu số 4 có trình tự tương đồng với nhiễm sắc thể 27 của *Leishmania* đoạn từ vị trí 251340 đến vị trí 268948



Hình 3.7. Cây chủng loại phát sinh của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát cái tại Việt Nam (Phương pháp Maximum likelihood, sử dụng gen trên kDNA)



Hình 3.8. Cây chủng loại phát sinh của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát cái tại Việt Nam (Phương pháp Maximum likelihood, sử dụng gen trên kDNA)



Hình 3.9. Cây chủng loại phát sinh của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát cái tại Việt Nam (Phương pháp Maximum likelihood, sử dụng gen trên NST 27)

Như vậy, kết quả giải trình tự gen cho thấy trong 3 mẫu có sự tương đồng với *Leishmania*, 2 mẫu được xác định là *Leishmania infantum* và 1 mẫu là *Leishmania sp*

3.3.3. Một số đặc điểm của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát

Trong số 6 tỉnh điều tra, kết quả sàng lọc ghi nhận sự hiện của *Leishmania* ở 3 tỉnh là Sơn La, Quảng Ninh và Ninh Bình. Các tỉnh còn lại là Hà Giang, Lào Cai và Lạng Sơn chưa tìm thấy dấu vết của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát. Tỷ lệ nhiễm *Leishmania* trên quần thể muỗi cát cái nghiên cứu của chúng tôi là 0,297% (n=3/1009).

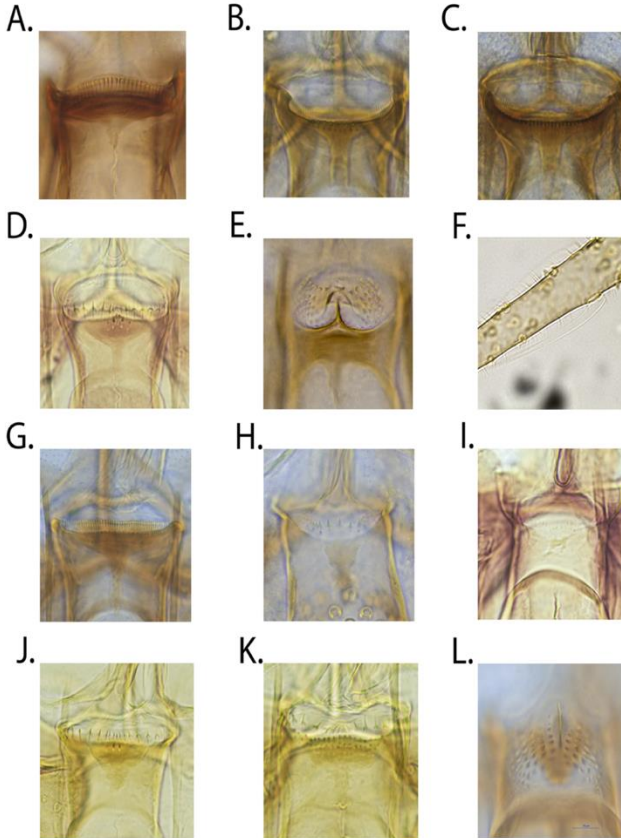
Bảng 3.9. Thông tin mẫu *Leishmania* trên quần thể muỗi cát

nh	Vĩ độ	Kinh độ	Muỗi cát	Sinh cảnh	<i>Leishmania</i>
1 La	21°11.063'	104°03.277'	<i>Phlebotomus sp.</i>	Chuồng lợn	<i>Leishmania infantum</i>
2 Ninh	20°59.615'	107°12.592'	NA	Hang	<i>Leishmania sp.</i>
Bình	20°14.457'	105°41.371'	<i>Sergentomyia sp2</i>	Ngoài nhà	<i>Leishmania infantum</i>

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Thành phần loài và một số đặc điểm sinh học sinh của muỗi cát tại 6 tỉnh miền núi phía bắc việt nam, 2016-2018

4.1.1. Định loài muỗi cát ở Việt Nam bằng các đặc điểm hình thái



Hình 4.3. Hình thái hàm của các con cái

Grassomyia indica (A), *Sergentomyia barraudi* group (B, C), *Se. khawi* (D), và *Se. anodontis* group (E), ascoid trên Đốt ăng ten 3 của *Se. sp.3* (F), hàm của *Se. brevicaulis* group (G), hàm của *Se. sylvatica* (GEN), hàm của *Se. bailyi* (I), hàm của *Se. hivernus* (J), hàm của *Se. perturbans* group (K), hàm của *Idiophlebotomus* sp. (L).

4.1.2. Sinh học sinh thái và sinh cảnh của muỗi cát ở các tỉnh điều tra

Giá trị độ phong phú loài cao nhất được tìm thấy trong hang động và ngoài trời (SR=15 bao gồm Se. sp2 và Se. sp3). Trong chuồng gia súc và trong nhà, sự phong phú của các loài dao động từ 5 đến 9, cho thấy nhiều hành vi ưa đột người hoặc sự hấp dẫn đối với động vật nuôi trong nhà đối với một số loài như *Ph. stantoni*. Trên thực tế, mặc dù loài này được tìm thấy trong mọi môi trường, nhưng nó là loài chính được thu thập chính ở trong nhà (11/30 mẫu vật; 36,67%) và trong chuồng chó (7/16 mẫu; 43,75%). Trong các hang động, loài này chỉ chiếm 2,24% (32/1431 mẫu vật). Cần có những nghiên cứu sâu hơn về sở thích kiếm ăn của loài này vì nó được mô tả là loài trong hang động ở Thái Lan (SRhang=26) và Malaysia (SRhang=18, n= 1548)

4.2. Thực trạng nhiễm Flavivirus ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu

4.2.1. Xác định Flavivirus trên muỗi cát

Trong nghiên cứu của chúng tôi, mẫu bệnh phẩm sau khi có sản phẩm RT-PCR được khuếch đại bằng cặp mồi cFD2/MAMD (250 bp) đã được giải trình tự đoạn gen để khẳng định

Kết quả trong nghiên cứu xác định được 2 trình tự tương đồng với vi rút DEN2. Điểm khác biệt của nghiên cứu là mẫu chúng tôi sàng lọc là dịch nghiền của muỗi cát cái còn trong nghiên cứu của Scaramozzino sử dụng mẫu bệnh phẩm trên người. Điều này cho thấy các chủng vi rút DEN2 mà muỗi cát cái mang có mối liên quan với các mẫu DEN2 trên bệnh nhân. Mặc dù điều này chưa chứng minh được vai trò truyền DEN2 nói riêng và Flavivirus nói chung của muỗi cát, tuy nhiên qua nghiên cứu này chúng ta cũng nhận thấy việc muỗi cát mang Flavivirus và đặc biệt là DEN2 là hoàn toàn có thể. Trong bối cảnh các vùng sinh thái tự nhiên đang bị thu hẹp do các tác động đô thị hoá thì khả năng các vi rút cũng biến đổi để thích nghi với điều kiện mới. Trong tương lai, chúng tôi gen vọng có thể có các nghiên cứu sâu hơn về vai trò truyền bệnh của các chủng vi rút này.

4.2.2. Tỷ lệ nhiễm Flavivirus trên muỗi cát

Một nghiên cứu khác của Gregory Moureau năm 2010 cũng công bố phát hiện ARN của Flavivirus trên muỗi cát. Trong nghiên cứu này, 1508 muỗi cát thu thập ở Pháp và Algeria, từ tháng 8 năm 2006 đến tháng 7 năm 2007, 2 pool con đực trong số 67 pool của loài

Phlebotomus perniciosus này ở Algeria đã dương tính với Flavivirus. Kết quả 2 pool này có trình tự tương đồng với các Flavivirus, liên quan đến côn trùng truyền của giống Culex. Đây là mô tả đầu tiên về các Flavivirus chỉ dành cho côn trùng thuộc họ Culicidae (bao gồm các giống muỗi Aedes, Culex, Mansonia, Anopheles), được tìm thấy trên muỗi cát thuộc họ Psychodidae. Điểm khác biệt của nghiên cứu này với nghiên cứu của chúng tôi là phát hiện được Flavivirus trên muỗi cát đực. Do vậy, trong tương lai khi sàng lọc Flavivirus trên muỗi cát chúng tôi sẽ đề xuất nên tiến hành cả trên con đực và con cái để hiểu rõ hơn bản chất của vi rút nhóm Flavivirus.

4.2.3. Một số đặc điểm của Flavivirus trên các loài muỗi cát cái

Phát hiện thấy dấu vết DEN2 trên muỗi cát cái thuộc giống *Sergentomyia* ở Việt Nam của chúng tôi chưa đủ để khẳng định việc chúng có truyền loại vi rút này hay không. Tuy nhiên trong tương lai giống *Sergentomyia* nói chung và 2 loài *Segentomyia (Parrotomyia) barraudi group* và *Segentomyia sp2* cần được nghiên cứu thêm để tìm hiểu vai trò của chúng trong việc truyền Flavivirus đặc biệt là Dengue týp 2.

4.3. Thực trạng nhiễm Leishmania ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu và nguy cơ lây truyền sang người

4.3.1. Leishmania xác định được tại Quảng Ninh

Bệnh Leishmaniasis nội tạng trên người lần đầu được báo cáo vào năm 2000 tại tỉnh Quảng Ninh. Những trường hợp này đặt ra câu hỏi về sự lây truyền leishmania địa phương ở Việt Nam. Mẫu thu thập từ một bệnh nhân ở Quảng Ninh được Viện liên quốc gia Queensland, Brisbane, Australia xác định là *Leishmania infantum* hoặc *L. donovani*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sàng lọc được 1 mẫu Leishmania sp. từ cá thể muỗi cát bắt tại một hang đá gần với vị trí nhà bệnh nhân ghi nhận năm 2000. Kết quả giải trình tự gen của chủng Leishmania trong nghiên cứu đã xác định có trình tự tương đồng 99,89% với *L. infantum* hoặc *L. donovani* (Hình 3.9). Điều này hoàn toàn tương đồng với kết quả phân lập từ bệnh nhân của Viện liên quốc gia Queensland, Brisbane, Australia.

4.3.2. Leishmania xác định được tại Sơn La

Trong mẫu *Leishmania* dương tính của Sơn La chúng tôi phát hiện thấy 7 trình tự gen tương đồng với 8 class (class 13, 16, 18, 25, 31, 38, 39 và 50) trên minicircle kinetoplas của các chủng *Leishmania infantum* đã công bố. Điều này cho thấy sự phức tạp trong cấu trúc di truyền của nhóm ký sinh trùng này. Các gen vòng trên các kinetoplas có độ lặp cao, phân hoá nhiều lớp, nếu không sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen NSG thì rất khó có thể phân tích và tách biệt được những đoạn lặp này (Bảng 3.9).

4.3.3. *Leishmania* xác định được tại Ninh Bình

Tương tự như chủng ở Sơn La, trong mẫu *Leishmania* chúng tôi thu thập ở Ninh Bình cho thấy 2 trình tự tương đồng với các trình tự của các chủng *Leishmania infantum* đã công bố trên class 16 và 25 thuộc minicircle kinetoplas.

Tuy rằng với những dữ liệu này chưa đủ để kết luận *Se. sp2* là véc tơ truyền *L. infantum* nhưng phát hiện này lần đầu tiên khẳng định sự có mặt của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát tại Việt Nam, hơn nữa là một chủng gây bệnh thể nội tạng rất nguy hiểm. Muỗi cát giống *Sergentomyia* từ trước tới nay chưa được ghi nhận truyền *Leishmania* nên những hiểu biết về chúng còn nhiều hạn chế. Với kết quả của đề tài, chúng tôi nghĩ nên tăng thêm vai trò của véc tơ truyền bệnh của giống *Sergentomyia* và nên đưa vào giám sát để làm rõ vai trò truyền bệnh của giống *Sergentomyia* nói chung và loài *Se. sp2* nói riêng

Hạn chế của nghiên cứu

Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi phát hiện 2 loài muỗi cát mới là *Se. sp2* và *Se. sp3*. Hiện tại, chúng tôi đang thu thập thêm các thông tin liên quan đồng thời kết hợp với các chuyên gia về muỗi cát trong và ngoài nước để khẳng định.

Việc tìm thấy dấu vết của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát cái ở Việt Nam là một phát hiện rất mới. Tuy nhiên, điều này vẫn chưa chứng minh được vai trò truyền ký sinh trùng *Leishmania* của các loài muỗi cát ở Việt Nam, còn thiếu rất nhiều bằng chứng cần bổ sung như khả năng lây truyền, sự nhân lên của vi rút trong cơ thể các loài muỗi cát đó. Trong tương lai, khi có thể nuôi, nhân dòng được các loài muỗi cát, phân lập được các chủng *Leishmania* gây bệnh, chúng tôi hy vọng sẽ

cung cấp thông tin đầy đủ hơn về vai trò truyền bệnh của véc tơ này ở Việt Nam.

So sánh với các nghiên cứu khác công bố phát hiện ra Flavivirus trên muỗi cát, các nghiên cứu đó đã tiến hành phân lập được các chủng vi rút, cho phép thu nhận được trình tự các đoạn gen của vi rút hoàn chỉnh hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi không tiến hành phân lập, do vậy các kết quả chỉ dừng lại ở mức độ ghi nhận dấu vết có Flavivirus trên mẫu muỗi cát cái thu thập được. Mặt khác, một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy rằng các cá thể muỗi cát đực cũng có khả năng bị nhiễm Flavivirus, trong nghiên cứu này chúng tôi mới thực hiện sàng lọc trên các muỗi cát cái. Do vậy, với các nghiên cứu sau này chúng tôi sẽ có thể tiến hành trên cả các mẫu muỗi cát đực.

KẾT LUẬN

1. Thành phần loài và một số đặc điểm phân bố của muỗi cát tại 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2016-2018

Tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam đã thu thập được 2585 con muỗi cát, trong đó có 1511 con đực (58,5%) và 1049 con cái (40,6%), ghi nhận 5 giống muỗi cát: *Sergentomyia* (n=2067, 79,96%) chiếm tỷ lệ cao nhất, *Phlebotomus* (n=340, 13,15%), *Chinus* (n=31, 1,2%), *Idiophlebotomus* (n=14, 0,54%) và *Grassomyia* (n=6, 0,23%).

Tổng số 15 loài muỗi cát được ghi nhận, trong đó có 13 loài muỗi cát được định danh. Muỗi cát chưa định danh có 2 loài là *Sergentomyia sp2.* và *Sergentomyia sp3.*

Muỗi cát ghi nhận có mặt ở tất cả các sinh cảnh bao gồm: trong nhà (n=30), ngoài nhà (n=936), trong chuồng gia súc (n=65), gia cầm (n=66), chuồng lợn (n=41), chuồng chó (n=16) và hang động (n=1431). Muỗi cát chủ yếu được thu thập trong các hang động. Độ phong phú loài cao nhất là ở hang và sinh cảnh ngoài nhà SR=15 (bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3*).

2. Thực trạng nhiễm Flavivirus ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu

Tỉ lệ muỗi cát cái mang ARN của vi rút DEN2 trong nghiên cứu là 0,198% (n=2).

3. Thực trạng nhiễm Leishmania ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu

Leishmania được xác định trên quần thể muỗi cát cái ở 3 tỉnh là Sơn La, Quảng Ninh và Ninh Bình. Tỷ lệ nhiễm Leishmania nhiễm trên quần thể muỗi cát cái nghiên cứu là 3/1009 cá thể (0,297%).

KIẾN NGHỊ

1. Tăng cường thêm các cuộc điều tra thu thập muỗi cát tại các tỉnh khác để có thêm số liệu so sánh với kết quả của nghiên cứu.
2. Tiếp tục và mở rộng các nghiên cứu về hình thái học và sinh học phân tử để định loại chính xác các véc tơ muỗi các truyền bệnh và làm rõ thêm vai trò của các tác nhân gây bệnh như Flavivirus đặc biệt là DEN2 và Leishmania trên muỗi cát để có bức tranh tổng thể và toàn diện hơn.
3. Mở rộng triển khai nghiên cứu về tập tính, sinh học sinh thái của muỗi cát trong các sinh cảnh gần người để có các biện pháp phòng chống chủ động trong bối cảnh tìm thấy ARN của DEN2 và Leishmania trên các cá thể muỗi cát cái.